

УДК 577.171.55 (616.33-002, 678.048)

О. О. Цвях, В. С. ЧЕРНО

Миколаївський національний університет ім. В. О. Сухомлинського

ЗМІНИ СТАНУ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ШЛУНКА ЩУРІВ ПРИ СТРЕСІ НА ФОНІ ТРИВАЛОГО ЗАСТОСУВАННЯ МЕЛАТОНІНУ

Тривале застосування мелатоніну та моделювання іммобілізаційного стресу на фоні тривалої гіпермелатонімії призводить до змін стану прооксидантно-антиоксидантної системи. Зростання рівня продуктів перекисного окиснення на фоні зниження активності КТ та ГПО та збереження активності СОД свідчить про зсув рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи в бік ВРПО та прооксидантів. Також відбуваються морфологічні зміни у шлунку, про що свідчить зростання середньої кількості деструкцій на одного щура та зростання індексу Паулса.

Ключові слова: мелатонін; прооксидантно-антиоксидантна система; стрес; гіпермелатонімія; шлунок; виразки

ВСТУП

В останні десятиліття науковці та медики активно вивчають фізіологічні впливи мелатоніну на різні органи та системи організму. Гормон епіфізу володіє сомногенним ефектом, є регулятором циркадіанної системи організму, стимулятором імунної системи, проявляє геро-, канцеро- та стресопротекторні властивості та є антиоксидантом (Анісімов В. Н. зі співавт., 2000; Пішак В. П., 2003; Комаров Ф. І. зі співавт., 2004; Барабой В. А., 2006; Цебржинський О. І., 2012; Чекман І. С., Беленічев І. Ф. зі співавт., 2014). Але довготривалі впливи мелатоніну на стан органів, зокрема на шлунок, ще недостатньо добре вивчені.

Дослідження останніх років показали, що в патогенезі багатьох захворювань не останню роль відіграє оксидативний стрес [2, 14], який виникає при дії на організм різноманітних факторів, у тому числі і звичайного стресу.

Встановлено, що стрес призводить до посилення вільнорадикального перекисного окиснення (ВРПО), а як наслідок – до окиснювального порушення цілісності тканин і виникнення гастродуоденальних ерозій та виразок [7, 8]. Для профілактики ВРПО та корекції патологій, викликаних вільними радикалами, в сучасній медичній практиці використовують цілий ряд антиоксидантів. Оскільки мелатонін є стресопротектором, стимулятором імунної системи та антиоксидантом (АО) [2, 14], він здатен позитивно впливати на стан шлунково-кишкового тракту та здійснювати антиульцеровий ефект [1, 4, 11, 12]. Механізми антиоксидантної дії мелатоніну пов'язані зі здатні-

стю безпосередньо знешкоджувати вільні радикали, а також виступати непрямим антиоксидантом, посилюючи експресію генів АО ферментів: супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО) [2, 5, 14].

Практичний інтерес представляє вивчення змін показників прооксидантно-антиоксидантної системи (ПАС) у тканинах шлунку при дії іммобілізаційного стресу на тлі довготривалої гіпермелатонімії, що і стало метою нашої роботи. Отже, основними завданнями стало визначення біохімічних показників ПАС шлунка щурів при моделюванні стресових виразок на фоні тривалої гіпермелатонімії та з'ясування особливостей морфологічних змін тканин шлунка в умовах експерименту.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на 20 самцях щурів лінії Wistar середньою масою 260-300 г. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

У кожній групі було по 5 щурів: перша – інтактна (умовна норма); у тварин другої моделювали гіпермелатонімію: щурам цієї групи вводили мелатонін впродовж 30 днів (per os 1 мг/кг маси тіла на добу) [9]; у тварин третьої групи моделювали стресові виразки шлунка шляхом іммобілізації тварин на 5 годин одноразово за Сельє на двадцять дев'ятий день експерименту; тварин четвертої групи під-

Таблиця 1

ЗМІНИ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ПАС У ТКАНИНАХ ШЛУНКА БІЛИХ ЩУРІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ НА 30 ДОБУ НОРМО- ТА ГІПЕРМЕЛАТОНІНЕМІЇ, ($M \pm m$)

Показник \ Група	Інтакт (n=5)	Стрес (n=5)	Гіпермелатонінемія (n=5)	Стрес на фоні гіпермелатонінемії (n=5)
Дієнові кон'югати, ммоль/кг	6,61 ± 0,06	10,17 ± 0,35 $p_1 \leq 0,001$	7,93 ± 0,11 $P_1 \leq 0,001$	7,14 ± 0,06 $p_1 \leq 0,001$, $p_2 \leq 0,001$, $p_3 \leq 0,001$
ТБК-реактивні продукти, мкмоль/кг	12,6 ± 0,46	28,42 ± 1,35 $p_1 \leq 0,001$	32,02 ± 1,72 $p_1 \leq 0,001$	34,66 ± 1,89 $p_1 \leq 0,001$, $p_2 \leq 0,05$
Активність СОД, ум. од./г	0,576 ± 0,029	0,737 ± 0,014 $p_1 \leq 0,001$	0,204 ± 0,018 $P_1 \leq 0,001$	0,605 ± 0,046 $p_2 \leq 0,05$, $p_3 \leq 0,001$
Активність каталази, мкат/кг	2,274 ± 0,148	2,504 ± 0,177	3,032 ± 0,042 $p_1 \leq 0,001$	2,208 ± 0,171 $p_3 \leq 0,001$
Активність глутатіон-пероксидази мкат/кг	5,834 ± 0,164	5,576 ± 0,117	3,926 ± 0,09 $p_1 \leq 0,001$	4,018 ± 0,162 $p_1 \leq 0,001$, $p_2 \leq 0,001$

Примітка: p_1 – у порівнянні з інтактом; p_2 – у порівнянні зі стрес-контролем; p_3 – в порівнянні з гіпер-контролем.

давали іммобілізаційному стресу на двадцять дев'ятий день гіпермелатонінемії, а на тридцятий проводили евтаназію декапітацією. Робили відбір шлунка для подальшої роботи.

У шлунковому соку визначали рН. На слизовій оболонці шлунка обчислювали кількість виразок та підраховували індекс Паулса (Pauls F., Wick A. M., Mac Key E. M. et al., 1947; Добряков Ю. І., 1978) за формулою:

$$n / 100 \times p,$$

де: n – середнє число деструкцій на 1 тварину;
p – % тварин з виразками.

У гомогенаті тканин шлунка визначали концентрації первинних (дієнові кон'югати – ДК за методом Стальної І. Д.) та вторинних (ТБК-реактивні продукти за методом Стальної І. Д., Гаришвілі Т. Г.) продуктів ВРПО [10]. Також визначали в гомогенаті шлунка активність супероксиддисмутази (СОД) за методом Чевари С., Чаба І. [13], каталази за методом М. А. Королюка, Л. І. Іваної [2], глутатіонпероксидази (ГПО) за методом В. О. Пахомової [6], загальну протеолітичну активність (ЗПА) за Kunitz.

Статистичний аналіз проводили з використанням комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показали наші дослідження, вміст первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів та ТБК-активних продуктів при моделюванні іммобілізаційного стресу на фоні 30-добової нормо- і гіпермелатонінемії змінюється, відбуваються зміни і в роботі ферментативної ланки антиоксидантного захисту. Отримані дані презентовані у вигляді табл. 1.

За умов іммобілізаційного стресу концентрація ДК зросла в 1,54 рази в порівнянні з інтактною групою. При довготривалій гіпермелатонінемії рівень ДК виріс майже на 20 %. При іммобілізаційному стресі на фоні тривалої гіпермелатонінемії концентрація ДК зросла в порівнянні з інтактом на 8 %, але виявилася меншою, ніж у стрес-контролі на 29,79 % і менше, ніж у гіпер-контролі на 9,96 %.

При іммобілізаційному стресі концентрація ТБК-реактивних продуктів зростає в порівнянні з інтактом у 2,25 рази. При 30-ти добовій гіпермелатонінемії концентрація ТБК-реактивних продуктів у гомогенатах шлунка зросла у 2,54 рази в порівнянні з інтактом. У групі тварин, які піддавалися іммобілізаційному стресу на фоні 30-добової гіпермелатонінемії, концентрація ТБК-реактивних продуктів виявилася найвищою: в порівнянні з інтактом зросла майже в 3 рази, в порівнянні зі стрес-контролем зросла на 21,96 %.

Активність антиоксидантних ферментів в умовах гіпермелатонінемії та стресу на її фоні змінювалась неоднозначно. При іммобілізаційному стресі активність СОД зросла на 27,95 %. У групі з гіпермелатонінемією активність цього ферменту знизилася в порівнянні з інтактом майже в 3 рази. При моделюванні іммобілізаційного стресу на фоні тривалої гіпермелатонінемії активність ферменту СОД неістотно зросла в порівнянні з інтактом (на 5 %), в порівнянні зі стрес-контролем активність знизилася на 17,9 %, а в порівнянні з групою з тривалою гіпермелатонінемією активність СОД виявилася більшою у 2,97 рази.

При моделюванні іммобілізаційного стресу активність КТ у тканинах шлунка практично не зміни-

Таблиця 2

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА БІЛИХ ЩУРІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ НА 30 ДОБУ НОРМО- ТА ГІПЕРМЕЛАТОНІНЕМІЇ

Показник \ Група	Інтакт (n=5)	Стрес (n=5)	Гіпермелатонінемія (n=5)	Стрес на фоні гіпермелатонінемії (n=5)
Частота уражень, %	0	100	100	100
Середня кількість деструкцій на 1-го щура	0	4,4	1,2	5,2
Середній ступінь виразки (СВ) у групі	0	2,2	1,2	2,2
Індекс Паулса (ІП)	0	4,4	1,2	5,2

лася, при гіпермелатонінемії активність КТ збільшилася на 33,3 %. А стрес на фоні тривалої гіпермелатонінемії призвів до зниження активності КТ в порівнянні з гіпер-контролем на 27,18 %, хоча в порівнянні з іншими групами активність КТ практично не змінилася.

При іммобілізаційному стресі активність ГПО в порівнянні з інтактом змінилася несуттєво, а саме знизилася на 4,4 %. При гіпермелатонінемії активність ГПО знизилася в порівнянні з показником в інтактній групі на 32,71 %. При моделюванні іммобілізаційного стресу на 30 добу гіпермелатонінемії активність ГПО знизилася в порівнянні з інтактом на 31,13 % та стрес-контролем – на 27,94 %.

Отримані нами дані про значне зростання рівня вторинних продуктів перекисного окиснення у групі, де моделювали стресові виразки шляхом іммобілізації на фоні гіпермелатонінемії, на фоні зниження активності КТ і ГПО та збереження активності СОД на рівні інтактною групи, можуть свідчити про зсув рівноваги у ПАС у бік ВРПО та прооксидантів.

Визначення величини рН у експериментальних групах показало підвищення кислотності при гіпермелатонінемії та при стресі в порівнянні з інтактною групою. Що стосується групи тварин, стресованих на фоні гіпермелатонінемії, то величина рН зросла в порівнянні з інтактною групою не суттєво. Загальна протеолітична активність (ЗПА) тканин шлунка щурів змінюється: при дії стресу зростає у 5 разів, при тривалій гіпермелатонінемії – майже у 2 рази. При моделюванні виразок шляхом іммобілізації тварин на фоні гіпермелатонінемії спостерігалось зростання рівня ЗПА в порівнянні з інтактом у 2,3 рази, але в порівнянні зі стрес-контролем активність виявилася меншою у 2 рази. Функціональна активність шлунка в умовах експерименту не зменшилася.

В експерименті спостерігалися морфологічні зміни у шлунку. Так, при макроскопічному дослідженні шлунків тварин у групах з тривалою гіпермелатонінемією спостерігалось незначне зростання середньої кількості деструкцій на одну тварину, а також середній ступінь виразки і індекс Паулса. При іммобілізаційному стресі спостерігалось зростання тяжкості виразкового процесу в шлунку щурів: збільшилася се-

редня кількість деструкцій на одну тварину, зріс середній ступінь виразки в групі, збільшився індекс Паулса. В умовах тривалої гіпермелатонінемії іммобілізаційний стрес завдав більших ушкоджень, ніж у стрес-контрольній групі: зокрема середня кількість деструкцій на одну тварину в групі на 18 % більше, середній ступінь виразки (СВ) у групі був такий же, як і в стрес-контролі, індекс Паулса був на 18 % більше, ніж у стрес-контролі (див. табл. 2).

ВИСНОВКИ

1. У групі тварин, яким моделювали виразки шлунка шляхом іммобілізаційного стресу на фоні гіпермелатонінемії, встановили зростання рівня первинних продуктів та значне зростання рівня вторинних продуктів перекисного окиснення, що на фоні зниження активності КТ і ГПО та збереження активності СОД на рівні інтактною групи свідчить про зсув рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи в бік ВРПО та прооксидантів.
2. У групі з моделлю іммобілізаційного стресу на фоні тривалої гіпермелатонінемії відбулися морфологічні зміни у шлунку, про що свідчить зростання середньої кількості деструкцій на одного щура та зростання індексу Паулса. Ріст цих показників свідчить про відсутність антиульцерогенного ефекту мелатоніну при його тривалому застосуванні та вказує на можливість розвитку більш серйозних патологічних процесів.
3. Тривале застосування мелатоніну продемонструвало неочікуваний негативний вплив на показники ПОЛ та рівень антиоксидантного захисту, а також на стан тканин шлунка, що вказує на перспективи подальших досліджень та необхідність корекції існуючих протоколів застосування мелатоніну.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Анисимов В. Н. Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта / [В. Н. Анисимов, И. М. Кветной, Ф. И. Комаров и др.]. – М. : Советский спорт, 2000. – 204 с.

2. Барабой В. А. Биоантиоксиданты / В. А. Барабой. – К. : Книга плюс, 2006. – 462 с.
3. Кароліюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Кароліюк, Л. И. Иванова, Н. Т. Майорова, К. Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1998. – № 1. – С. 16-18.
4. Малиновская Н. К. Мелатонин и язвенная болезнь: автореф. дисс. ... докт. мед. наук : спец. 14.00.47 «Гастроэнтерология» / Н. К. Малиновская. – М.: Московская мед. академия им. И. М. Сеченова, 1998. – 47 с.
5. Мелатонин в норме и патологии / Под ред. Ф. И. Комарова, С. И. Комарова, С. И. Рапопорта, Н. К. Малиновской, В. Н. Анисимова. – М.: ИД Медпрактика, 2004. – 308 с.
6. Пахомова В. А. Способ определения активности глутатионпероксидазы в биологических тканях / [В. А. Пахомова, Г. Н. Крюкова, Н. П. Козлянина и др.] // А.с. 922637 СССР, МКИ в G 01. Оpubл.: 23.04.1982. – Биол. ИиО № 15. – 2 с.
7. Передерій В. Г. Стрес і його наслідки / В. Г. Передерій, М. М. Безюк // Укр. мед. часопис. – 2003. – № 6 (38). – XI/XII. – С. 65-69.
8. Перекисное окисление и стресс / В. А. Барабой, И. И. Брахман, В. Г. Голотин, Ю. Б. Кудряшов. – С.Пб. : Наука, 1992. – 148 с.
9. Пішак В. П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації / В. П. Пішак. – Чернівці : Медакадемія, 2003. – 152 с.
10. Стальная И. Д. Современные методы в биохимии / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили. – М.: Медицина, 1977. – С. 63, 66-68.
11. Тарасенко Л. М. Особенности реакции желудка на острый и хронический стрессы, а также их сочетание / [Л. М. Тарасенко, В. Ф. Гребенникова, Т. А. Девяткина и др.] // Физиол. журн. – 1989. – Т. 35, № 5. – С. 78-82.
12. Тарасенко Л. М. Роль ендотеліальної дисфункції у виразкоутворенні шлунка за умов гострого стресу / Л. М. Тарасенко, О. Є. Омельченко // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 2). – С. 175.
13. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее активности в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.
14. Чекман И. С. Антиоксиданты: клинико-фармакологический аспект / [И. С. Чекман, И. Ф. Белевичев, Н. А. Горчакова и др.] // Укр. мед. часопис. – 2014. – № 1 (99) – I/II. – С. 22-28.

УДК 577.171.55 (616.33-002, 678.048)**О. О. Цвях, В. С. Черно****ИЗМЕНЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЖЕЛУДКА КРЫС НА ФОНЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕЛАТОНИНА**

Длительное применение мелатонина и моделирование язв путем иммобилизации на фоне длительной гипермеланинемии приводит к изменениям состояния прооксидантно-антиоксидантной системы. Рост уровня продуктов перекисного окисления на фоне снижения активности КТ и ГПО и сохранения активности СОД свидетельствует о смещении равновесия прооксидантно-антиоксидантной системы в сторону ВРПО и прооксидантов. Также происходят морфологические изменения в желудке, о чем свидетельствует рост среднего количества деструкции на одну крысу и рост индекса Паулса.

Ключевые слова: мелатонин; прооксидантно-антиоксидантная система; стресс; гипермеланинемия; желудок; язвы

UDC 577.171.55 (616.33-002, 678.048)**O. O. Tsvyakh, V. S. Chernov****THE STATE CHANGES OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE STOMACH OF RATS UNDER STRESS ON THE BACKGROUND OF A LONG-TERM USE OF MELATONIN**

A long-term use of melatonin and immobilization stress simulation on the background of a long hypermelaninemia leads to the changes of the prooxidant-antioxidant system. The increase of the peroxidation products level on the background of the decreased CT and GPO activity and the conservation of SOD activity, indicates a shift of the prooxidant-antioxidant system balance in the direction of FRPO and prooxidant. Morphological changes also occur in the stomach, that is proved by the increase in the average number of destruction per rat and the increase of Pauls index.

Key words: melatonin; prooxidant-antioxidant system; stress; hypermelaninemia; stomach; ulcers

Адреса для листування:

54030, м. Миколаїв, вул. Нікольська, 24.

Тел. (050) 157-51-31. E-mail: tsviakho@mail.ru.

Миколаївський національний університет

ім. В. О. Сухомлинського

Надійшла до редакції 20.09.2016 р.